

(19)



Europäisches Patentamt
European Patent Office
Office européen des brevets



(11)

EP 0 464 533 B1

(12)

EUROPÄISCHE PATENTSCHRIFT

(45) Veröffentlichungstag und Bekanntmachung des
Hinweises auf die Patenterteilung:
29.07.1998 Patentblatt 1998/31

(51) Int Cl. 6: C07K 16/00, C12N 15/62,
A61K 38/00, A61K 39/395

(21) Anmeldenummer: 91110307.5

(22) Anmeldetag: 22.06.1991

(54) Fusionsproteine mit immunglobulinanteilen, ihre Herstellung und Verwendung

Fusionproteins with parts of immunoglobulins, their production and use

Protéines fusionnées avec des portions d'immunoglobulines, leurs production et utilisation

(84) Benannte Vertragsstaaten:
AT BE CH DE DK ES FR GB GR IT LI LU NL SE

- Oquendo, Patricia, Dr.
W-3550 Marburg (DE)
- Zettlmeissl, Gerd, Dr.
W-3551 Lahntal-Grossfelden (DE)
- Seed, Brian, Dr.
Boston, MA 02114 (US)

(30) Priorität: 28.06.1990 DE 4020607

(43) Veröffentlichungstag der Anmeldung:
08.01.1992 Patentblatt 1992/02

(60) Teilanmeldung: 97120664.4 / 0 835 939

(73) Patentinhaber:

- HOECHST AKTIENGESELLSCHAFT
65926 Frankfurt am Main (DE)
- THE GENERAL HOSPITAL CORPORATION
Boston, MA 02114 (US)

(72) Erfinder:

- Lauffer, Leander, Dr.
W-3550 Marburg (DE)

(56) Entgegenhaltungen:

EP-A- 269 455	EP-A- 325 262
EP-A- 414 178	EP-A- 417 563
EP-A- 418 014	

- P.N.A.S. (1991) 88:10535

Bemerkungen:

Die Akte enthält technische Angaben, die nach dem
Eingang der Anmeldung eingereicht wurden und die
nicht in dieser Patentschrift enthalten sind.

EP 0 464 533 B1

Anmerkung: Innerhalb von neun Monaten nach der Bekanntmachung des Hinweises auf die Erteilung des europäischen Patents kann jedermann beim Europäischen Patentamt gegen das erteilte europäische Patent Einspruch einlegen. Der Einspruch ist schriftlich einzureichen und zu begründen. Er gilt erst als eingelegt, wenn die Einspruchsgebühr entrichtet worden ist. (Art. 99(1) Europäisches Patentübereinkommen).

Beschreibung

Die Erfindung bezieht sich auf das Gebiet von gentechnisch erzeugten löslichen Fusionsproteinen bestehend aus nicht zur Immunglobulinfamilie gehörigen humanen Proteinen oder Teilen davon und verschiedenen Anteilen der konstanten Region von Immunglobulinmolekülen. Die funktionellen Eigenschaften beider Fusionspartner bleiben überraschenderweise im Fusionsprotein erhalten.

Aus der EP-A 0325 262 und der EP-A 0314 317 sind entsprechende Fusionsproteine bestehend aus verschiedenen Domänen des CD4-Membranproteins menschlicher T-Zellen und aus humanen IgG1-Anteilen bekannt. Einige dieser Fusionsproteine binden mit gleicher Affinität an das Glykoprotein gp120 des Humanen Immundefizienz-Virus wie das zellgebundene CD4 Molekül. Das CD4-Molekül gehört zur Immunglobulinfamilie und ist folglich bezüglich seiner Tertiärstruktur sehr ähnlich aufgebaut wie Immunglobulinmoleküle. Dies gilt auch für die α -Kette des T-Zell-Antigenrezeptors, für die solche Fusionen ebenfalls beschrieben wurden (Gascoigne et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, Bd. 84 (1987), 2937-2940). Aufgrund der sehr ähnlichen Domänenstruktur war deshalb in diesem Fall die Beibehaltung der biologischen Aktivität der beiden Fusionspartner im Fusionsprotein zu erwarten.

In der europäischen Patentanmeldung Nr. 0 417 563 sind DNA-Sequenzen beschrieben, die für eine Teilsequenz für lösliche Fragmente von nicht-löslichen Proteinen, die Tumornekrosefaktor (TNF) binden, kodiert. Zusätzlich ist dort eine andere Teilsequenz genannt, die für alle Domänen außer der ersten Domäne der konstanten Region der schweren Kette von humanen Immunglobulinen wie IgG, IgA, IgM bzw. IgE kodiert.

Die nachveröffentlichte europäische Patentanmeldung Nr. 0 418 014 offenbart auf der Seite 8, Zeilen 18-25 chimäre Antikörpermoleküle, bei denen lediglich die variablen Domänen der Immunglobulinmoleküle durch TNF-R Sequenzen ersetzt wurden.

Gegenstand der Erfindung sind lösliche Fusionsproteine bestehend aus dem extrazellulären Anteil von humanem Tumor-Nekrose-Faktor-Rezeptor oder einem funktionellen Teil davon und einem Fc-Teil eines Immunglobulinmoleküls, ausgewählt aus einer der Immunglobulinklassen IgG, IgM, IgA und IgE.

Die Fusionsproteine können in bekannten pro- und eukaryontischen Expressionssystemen hergestellt werden, vorzugsweise jedoch in Säugerzellen (z.B. CHO-, COS-, BHK-Zellen).

Die erfindungsgemäßen Fusionsproteine sind aufgrund ihres Immunglobulinanteils mittels Affinitätschromatographie leicht zu reinigen und besitzen verbesserte pharmakokinetische Eigenschaften *in vivo*.

In vielen Fällen ist der Fc-Teil im Fusionsprotein für den Einsatz in Therapie und Diagnostik durchaus vorteilhaft und führt so z.B. zu verbesserten pharmakokinetischen Eigenschaften (EP-A 0232 262).

Es existieren verschiedene Proteasen, deren Verwendung für diesen Zweck als denkbar erscheint. Papain oder Pepsin werden beispielsweise für die Erzeugung von F(ab)-Fragmenten aus Immunglobulinen eingesetzt (Immunology, Hrsg. Roitt, I. et al., Gower Medical Publishing, London (1989)), jedoch spalten sie nicht sonderlich spezifisch. Der Blutgerinnungsfaktor Xa hingegen erkennt in einem Protein die relativ seltene Tetrapeptidsequenz Ile-Glu-Gly-Arg und führt eine hydrolytische Spaltung des Proteins nach dem Argininrest durch. Spaltsequenzen, die das beschriebene Tetrapeptid enthalten, wurden zuerst von Nagai und Thogersen in ein Hybridprotein auf gentechnologischem Wege eingeführt (Nagai, K. und Thogersen, H.C., Nature, Bd. 309 (1984), 810-812). Diese Autoren konnten zeigen, daß die in *E. coli* exprimierten Proteine tatsächlich spezifisch von Faktor Xa gespalten werden. Aus Publikationen ist jedoch noch kein Beispiel bekannt, daß solche Proteine auch in eukaryotischen und insbesondere in

10 Animalzellen exprimiert und nach ihrer Reinigung von Faktor Xa gespalten werden können. Eine Expression der erfindungsgemäßen Proteine in Animalzellen ist jedoch vorzuziehen, da nur in einem solchen Zellsystem die Sezernierung von z.B. normalerweise membranständige Rezeptoren als Fusionspartner unter Beibehaltung ihrer nativen Struktur und damit ihrer biologischen Aktivität zu erwarten ist. Sezernierung in den Zellkulturüberstand erleichtert die nachfolgende einfache Reinigung des Fusionsproteins.

15 20 25 30 35 40 45 50 55 60 65 70 75 80 85 90 95 100 105 110 115 120 125 130 135 140 145 150 155 160 165 170 175 180 185 190 195 200 205 210 215 220 225 230 235 240 245 250 255 260 265 270 275 280 285 290 295 300 305 310 315 320 325 330 335 340 345 350 355 360 365 370 375 380 385 390 395 400 405 410 415 420 425 430 435 440 445 450 455 460 465 470 475 480 485 490 495 500 505 510 515 520 525 530 535 540 545 550 555 560 565 570 575 580 585 590 595 600 605 610 615 620 625 630 635 640 645 650 655 660 665 670 675 680 685 690 695 700 705 710 715 720 725 730 735 740 745 750 755 760 765 770 775 780 785 790 795 800 805 810 815 820 825 830 835 840 845 850 855 860 865 870 875 880 885 890 895 900 905 910 915 920 925 930 935 940 945 950 955 960 965 970 975 980 985 990 995 1000 1005 1010 1015 1020 1025 1030 1035 1040 1045 1050 1055 1060 1065 1070 1075 1080 1085 1090 1095 1100 1105 1110 1115 1120 1125 1130 1135 1140 1145 1150 1155 1160 1165 1170 1175 1180 1185 1190 1195 1200 1205 1210 1215 1220 1225 1230 1235 1240 1245 1250 1255 1260 1265 1270 1275 1280 1285 1290 1295 1300 1305 1310 1315 1320 1325 1330 1335 1340 1345 1350 1355 1360 1365 1370 1375 1380 1385 1390 1395 1400 1405 1410 1415 1420 1425 1430 1435 1440 1445 1450 1455 1460 1465 1470 1475 1480 1485 1490 1495 1500 1505 1510 1515 1520 1525 1530 1535 1540 1545 1550 1555 1560 1565 1570 1575 1580 1585 1590 1595 1600 1605 1610 1615 1620 1625 1630 1635 1640 1645 1650 1655 1660 1665 1670 1675 1680 1685 1690 1695 1700 1705 1710 1715 1720 1725 1730 1735 1740 1745 1750 1755 1760 1765 1770 1775 1780 1785 1790 1795 1800 1805 1810 1815 1820 1825 1830 1835 1840 1845 1850 1855 1860 1865 1870 1875 1880 1885 1890 1895 1900 1905 1910 1915 1920 1925 1930 1935 1940 1945 1950 1955 1960 1965 1970 1975 1980 1985 1990 1995 2000 2005 2010 2015 2020 2025 2030 2035 2040 2045 2050 2055 2060 2065 2070 2075 2080 2085 2090 2095 2100 2105 2110 2115 2120 2125 2130 2135 2140 2145 2150 2155 2160 2165 2170 2175 2180 2185 2190 2195 2200 2205 2210 2215 2220 2225 2230 2235 2240 2245 2250 2255 2260 2265 2270 2275 2280 2285 2290 2295 2300 2305 2310 2315 2320 2325 2330 2335 2340 2345 2350 2355 2360 2365 2370 2375 2380 2385 2390 2395 2400 2405 2410 2415 2420 2425 2430 2435 2440 2445 2450 2455 2460 2465 2470 2475 2480 2485 2490 2495 2500 2505 2510 2515 2520 2525 2530 2535 2540 2545 2550 2555 2560 2565 2570 2575 2580 2585 2590 2595 2600 2605 2610 2615 2620 2625 2630 2635 2640 2645 2650 2655 2660 2665 2670 2675 2680 2685 2690 2695 2700 2705 2710 2715 2720 2725 2730 2735 2740 2745 2750 2755 2760 2765 2770 2775 2780 2785 2790 2795 2800 2805 2810 2815 2820 2825 2830 2835 2840 2845 2850 2855 2860 2865 2870 2875 2880 2885 2890 2895 2900 2905 2910 2915 2920 2925 2930 2935 2940 2945 2950 2955 2960 2965 2970 2975 2980 2985 2990 2995 3000 3005 3010 3015 3020 3025 3030 3035 3040 3045 3050 3055 3060 3065 3070 3075 3080 3085 3090 3095 3100 3105 3110 3115 3120 3125 3130 3135 3140 3145 3150 3155 3160 3165 3170 3175 3180 3185 3190 3195 3200 3205 3210 3215 3220 3225 3230 3235 3240 3245 3250 3255 3260 3265 3270 3275 3280 3285 3290 3295 3300 3305 3310 3315 3320 3325 3330 3335 3340 3345 3350 3355 3360 3365 3370 3375 3380 3385 3390 3395 3400 3405 3410 3415 3420 3425 3430 3435 3440 3445 3450 3455 3460 3465 3470 3475 3480 3485 3490 3495 3500 3505 3510 3515 3520 3525 3530 3535 3540 3545 3550 3555 3560 3565 3570 3575 3580 3585 3590 3595 3600 3605 3610 3615 3620 3625 3630 3635 3640 3645 3650 3655 3660 3665 3670 3675 3680 3685 3690 3695 3700 3705 3710 3715 3720 3725 3730 3735 3740 3745 3750 3755 3760 3765 3770 3775 3780 3785 3790 3795 3800 3805 3810 3815 3820 3825 3830 3835 3840 3845 3850 3855 3860 3865 3870 3875 3880 3885 3890 3895 3900 3905 3910 3915 3920 3925 3930 3935 3940 3945 3950 3955 3960 3965 3970 3975 3980 3985 3990 3995 4000 4005 4010 4015 4020 4025 4030 4035 4040 4045 4050 4055 4060 4065 4070 4075 4080 4085 4090 4095 4100 4105 4110 4115 4120 4125 4130 4135 4140 4145 4150 4155 4160 4165 4170 4175 4180 4185 4190 4195 4200 4205 4210 4215 4220 4225 4230 4235 4240 4245 4250 4255 4260 4265 4270 4275 4280 4285 4290 4295 4300 4305 4310 4315 4320 4325 4330 4335 4340 4345 4350 4355 4360 4365 4370 4375 4380 4385 4390 4395 4400 4405 4410 4415 4420 4425 4430 4435 4440 4445 4450 4455 4460 4465 4470 4475 4480 4485 4490 4495 4500 4505 4510 4515 4520 4525 4530 4535 4540 4545 4550 4555 4560 4565 4570 4575 4580 4585 4590 4595 4600 4605 4610 4615 4620 4625 4630 4635 4640 4645 4650 4655 4660 4665 4670 4675 4680 4685 4690 4695 4700 4705 4710 4715 4720 4725 4730 4735 4740 4745 4750 4755 4760 4765 4770 4775 4780 4785 4790 4795 4800 4805 4810 4815 4820 4825 4830 4835 4840 4845 4850 4855 4860 4865 4870 4875 4880 4885 4890 4895 4900 4905 4910 4915 4920 4925 4930 4935 4940 4945 4950 4955 4960 4965 4970 4975 4980 4985 4990 4995 5000 5005 5010 5015 5020 5025 5030 5035 5040 5045 5050 5055 5060 5065 5070 5075 5080 5085 5090 5095 5100 5105 5110 5115 5120 5125 5130 5135 5140 5145 5150 5155 5160 5165 5170 5175 5180 5185 5190 5195 5200 5205 5210 5215 5220 5225 5230 5235 5240 5245 5250 5255 5260 5265 5270 5275 5280 5285 5290 5295 5300 5305 5310 5315 5320 5325 5330 5335 5340 5345 5350 5355 5360 5365 5370 5375 5380 5385 5390 5395 5400 5405 5410 5415 5420 5425 5430 5435 5440 5445 5450 5455 5460 5465 5470 5475 5480 5485 5490 5495 5500 5505 5510 5515 5520 5525 5530 5535 5540 5545 5550 5555 5560 5565 5570 5575 5580 5585 5590 5595 5600 5605 5610 5615 5620 5625 5630 5635 5640 5645 5650 5655 5660 5665 5670 5675 5680 5685 5690 5695 5700 5705 5710 5715 5720 5725 5730 5735 5740 5745 5750 5755 5760 5765 5770 5775 5780 5785 5790 5795 5800 5805 5810 5815 5820 5825 5830 5835 5840 5845 5850 5855 5860 5865 5870 5875 5880 5885 5890 5895 5900 5905 5910 5915 5920 5925 5930 5935 5940 5945 5950 5955 5960 5965 5970 5975 5980 5985 5990 5995 6000 6005 6010 6015 6020 6025 6030 6035 6040 6045 6050 6055 6060 6065 6070 6075 6080 6085 6090 6095 6100 6105 6110 6115 6120 6125 6130 6135 6140 6145 6150 6155 6160 6165 6170 6175 6180 6185 6190 6195 6200 6205 6210 6215 6220 6225 6230 6235 6240 6245 6250 6255 6260 6265 6270 6275 6280 6285 6290 6295 6300 6305 6310 6315 6320 6325 6330 6335 6340 6345 6350 6355 6360 6365 6370 6375 6380 6385 6390 6395 6400 6405 6410 6415 6420 6425 6430 6435 6440 6445 6450 6455 6460 6465 6470 6475 6480 6485 6490 6495 6500 6505 6510 6515 6520 6525 6530 6535 6540 6545 6550 6555 6560 6565 6570 6575 6580 6585 6590 6595 6600 6605 6610 6615 6620 6625 6630 6635 6640 6645 6650 6655 6660 6665 6670 6675 6680 6685 6690 6695 6700 6705 6710 6715 6720 6725 6730 6735 6740 6745 6750 6755 6760 6765 6770 6775 6780 6785 6790 6795 6800 6805 6810 6815 6820 6825 6830 6835 6840 6845 6850 6855 6860 6865 6870 6875 6880 6885 6890 6895 6900 6905 6910 6915 6920 6925 6930 6935 6940 6945 6950 6955 6960 6965 6970 6975 6980 6985 6990 6995 7000 7005 7010 7015 7020 7025 7030 7035 7040 7045 7050 7055 7060 7065 7070 7075 7080 7085 7090 7095 7100 7105 7110 7115 7120 7125 7130 7135 7140 7145 7150 7155 7160 7165 7170 7175 7180 7185 7190 7195 7200 7205 7210 7215 7220 7225 7230 7235 7240 7245 7250 7255 7260 7265 7270 7275 7280 7285 7290 7295 7300 7305 7310 7315 7320 7325 7330 7335 7340 7345 7350 7355 7360 7365 7370 7375 7380 7385 7390 7395 7400 7405 7410 7415 7420 7425 7430 7435 7440 7445 7450 7455 7460 7465 7470 7475 7480 7485 7490 7495 7500 7505 7510 7515 7520 7525 7530 7535 7540 7545 7550 7555 7560 7565 7570 7575 7580 7585 7590 7595 7600 7605 7610 7615 7620 7625 7630 7635 7640 7645 7650 7655 7660 7665 7670 7675 7680 7685 7690 7695 7700 7705 7710 7715 7720 7725 7730 7735 7740 7745 7750 7755 7760 7765 7770 7775 7780 7785 7790 7795 7800 7805 7810 7815 7820 7825 7830 7835 7840 7845 7850 7855 7860 7865 7870 7875 7880 7885 7890 7895 7900 7905 7910 7915 7920 7925 7930 7935 7940 7945 7950 7955 7960 7965 7970 7975 7980 7985 7990 7995 8000 8005 8010 8015 8020 8025 8030 8035 8040 8045 8050 8055 8060 8065 8070 8075 8080 8085 8090 8095 8100 8105 8110 8115 8120 8125 8130 8135 8140 8145 8150 8155 8160 8165 8170 8175 8180 8185 8190 8195 8200 8205 8210 8215 8220 8225 8230 8235 8240 8245 8250 8255 8260 8265 8270 8275 8280 8285 8290 8295 8300 8305 8310 8315 8320 8325 8330 8335 8340 8345 8350 8355 8360 8365 8370 8375 8380 8385 8390 8395 8400 8405 8410 8415 8420 8425 8430 8435 8440 8445 8450 8455 8460 8465 8470 8475 8480 8485 8490 8495 8500 8505 8510 8515 8520 8525 8530 8535 8540 8545 8550 8555 8560 8565 8570 8575 8580 8585 8590 8595 8600 8605 8610 8615 8620 8625 8630 8635 8640 8645 8650 8655 8660 8665 8670 8675 8680 8685 8690 8695 8700 8705 8710 8715 8720 8725 8730 8735 8740 8745 8750 8755 8760 8765 8770 8775 8780 8785 8790 8795 8800 8805 8810 8815 8820 8825 8830 8835 8840 8845 8850 8855 8860 8865 8870 8875 8880 8885 8890 8895 8900 8905 8910 8915 8920 8925 8930 8935 8940 8945 8950 8955 8960 8965 8970 8975 8980 8985 8990 8995 9000 9005 9010 9015 9020 9025 9030 9035 9040 9045 9050 9055 9060 9065 9070 9075 9080 9085 9090 9095 9100 9105 9110 9115 9120 9125 9130 9135 9140 9145 9150 9155 9160 9165 9170 9175 9180 9185 9190 9195 9200 9205 9210 9215 9220 9225 9230 9235 9240 9245 9250 9255 9260 9265 9270 9275 9280 9285 9290 9295 9300 9305 9310 9315 9320 9325 9330 9335 9340 9345 9350 9355 9360 9365 9370 9375 9380 9385 9390 9395 9400 9405 9410 9415 9420 9425 9430 9435 9440 9445 9450 9455 9460 9465 9470 9475 9480 9485 9490 9495 9500 9505 9510 9515 9520 9525 9530 9535 9540 9545 9550 9555 9560 9565 9570 9575 9580 9585 9590 9595 9600 9605 9610 9615 9620 9625 9630 9635 9640 9645 9650 9655 9660 9665 9670 9675 9680 9685 9690 9695 9700 9705 9710 9715 9720 9725 9730 9735 9740 9745 9750 9755 9760 9765 9770 9775 9780 9785 9790 9795 9800 9805 9810 9815 9820 9825 9830 9

lyse von Prothrombin gebildet. Für diesen Schritt ist aktiver Faktor X (Faktor Xa) verantwortlich, der in Gegenwart von Faktor Va und Calciumionen an Plateletmembranen bindet und Prothrombin spaltet.

Zwei Wege existieren zur Aktivierung von Faktor X, der extrinsische und der intrinsische "pathway". Im intrinsischen "pathway" wird eine Serie von Faktoren durch Proteolyse aktiviert, um jeweils selbst aktive Proteasen zu bilden. Im extrinsischen "pathway" wird Thromboplastin (Tissue Factor) von verletzten Zellen verstärkt synthetisiert und aktiviert Faktor X, zusammen mit Faktor VIIa und Calciumionen. Früher wurde angenommen, daß sich die Aktivität von Thromboplastin auf diese Reaktion beschränkt. Jedoch greift der Thromboplastin/VIIa-Komplex auf der Ebene von Faktor IX ebenfalls aktivierend in den intrinsischen "pathway" ein. Ein Thromboplastin/VIIa-Komplex ist also einer der wichtigsten physiologischen Aktivatoren der Blutgerinnung.

Es ist daher vorstellbar, daß Thromboplastin, abgesehen von seiner Verwendung als Diagnostikum (s.u.), auch als Bestandteil von Therapeutika zur Behandlung angeborener oder erworbener Blutgerinnungsdefizienzen eingesetzt werden kann. Beispiele hierfür sind chronische Hämophilien verursacht durch einen Mangel an Faktoren VIII, IX oder XI oder auch akute Störungen der Blutgerinnung als Folge von z.B. Leber- oder Nierenerkrankungen. Auch nach chirurgischen Eingriffen wäre der Einsatz eines solchen Therapeutikums denkbar.

Thromboplastin ist ein integrales Membranprotein, das nicht zur Immunglobulinfamilie gehört. Thromboplastin-cDNA-Sequenzen sind von insgesamt vier Gruppen veröffentlicht worden (Fisher et al., Thromb. Res., Bd. 48 (1987), 89-99; Morrissey et al., Cell, Bd. 50 (1987), 129-135; Scarpati et al., Biochemistry, Bd. 26 (1987), 5234-5238; Spicer et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, Bd. 84 (1987), 5148-5152). Die Thromboplastin-cDNA beinhaltet einen offenen Leserahmen, der für ein Polypeptid aus 295 Aminosäureresten kodiert, wovon die N-terminalen 32 Aminosäuren als Signalpeptid fungieren. Reifes Thromboplastin besteht aus 263 Aminosäureresten und besitzt eine Drei-Domänen-Struktur: i) aminoterminale extrazelluläre Domäne (219 Aminosäurereste); ii) Transmembranregion (23 Aminosäurereste); iii) cytoplasmatische Domäne (Carboxyterminus; 21 Aminosäurereste). In der extrazellulären Domäne existieren drei potentielle Stellen für N-Glykosylierung (Asn-X-Thr). Thromboplastin ist normalerweise glykosyliert, jedoch scheint die Glykosylierung nicht essentiell für die Aktivität des Proteins zu sein (Paborsky et al., Biochemistry, Bd. 28 (1989), 8072-8077).

Thromboplastin wird als Zusatz zu Plasmaproben in der Gerinnungsdiagnostik benötigt. Durch die einstufige Prothrombin-Gerinnungszeitbestimmung (z.B. Quick-Test) läßt sich der Gerinnungsstatus der untersuchten Person feststellen. Das für die Diagnostik erforderliche Thromboplastin wird gegenwärtig aus humanem Gewebe gewonnen, wobei das Herstellungsverfahren schwer standardisierbar ist, die Ausbeute niedrig

liegt und erhebliche Mengen humanes Ausgangsmaterial (Plazenten) bereit gestellt werden müssen. Andererseits ist zu erwarten, daß auch die gentechnische Herstellung von nativem, membrangebundenem Thromboplastin, bedingt durch komplexe Reinigungsverfahren, problematisch sein wird. Diese Problematiken können durch die erfindungsgemäße Fusion an Immunglobulinanteile umgangen werden.

Die erfindungsgemäßen Thromboplastin-Fusionsproteine werden von Säugerzellen (z.B. CHO-, BHK-, COS-Zellen) ins Kulturmedium ausgeschleust, über Affinitätschromatographie an Protein A-Sepharose gereinigt und besitzen überraschend hohe Aktivität in der einstufigen Prothrombin-Gerinnungszeitbestimmung.

15 Klonierung von Thromboplastin-cDNA

Zur Klonierung der Thromboplastin-cDNA wurde die publizierte Sequenz von Scarpati et al., Biochemistry, Bd. 26 (1987), 5234-5238, benutzt. Hieraus wurden zwei Oligonukleotidsondenmoleküle (s. Fig.1) abgeleitet. Mit diesen beiden Sondenmolekülen wurde eine cDNA-Bank aus humaner Placenta (Grundmann et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, Bd. 83 (1986), 8024-8028) abgesucht.

Es wurden verschiedene lange cDNA-Klone erhalten. Ein Klon, 2b-Apr5, der für das weitere Vorgehen verwendet wird, kodiert für die gleiche Aminosäuresequenz, wie die in Scarpati et al. beschriebene cDNA. In Fig. 2 ist die Gesamtsequenz des Klons 2b-Apr5 mit der daraus abgeleiteten Thromboplastin-Aminosäuresequenz dargestellt.

35 Konstruktion eines für Thromboplastin-Fusionsprotein kodierenden Hybridplasmids pTF1Fc.

Das Plasmid pCD4E gamma 1 (EP 0 325 262 A2; hinterlegt bei ATCC unter der Nummer No. 67610) dient zur Expression eines Fusionsproteins aus humanem CD4-Rezeptor und humanem IgG1. Die für die extrazelluläre Domäne von CD4 kodierende DNA-Sequenz wird aus diesem Plasmid mit den Restriktionsenzymen HindIII und BamHI entfernt. Mit dem Enzym HindIII darf hierbei nur eine teilweise Spaltung durchgeführt werden, um nur bei einer der zwei in pCD4E gamma 1 enthaltenen HindIII-Stellen zu schneiden (Position 2198). Es liegt dann ein geöffneter Vektor vor, bei dem eine eukaryotische Transkriptionsregulationssequenz (Promotor) von der offenen HindIII-Stelle gefolgt wird. Die offene BamHI-Stelle liegt am Beginn der kodierenden Regionen für einen Pentapeptidlinker, gefolgt von den Hinge- und den CH2- und CH3-Domänen vom menschlichen IgG1. Der Leserahmen in der BamHI-Erkennungssequenz GGATCC ist dergestalt, daß GAT als Asparaginsäure translatiert wird. DNA-Amplifizierung mit thermostabiler DNA-Polymerase ermöglicht eine gegebene Sequenz so zu verändern, daß an eines oder beide Enden beliebige Sequenzen angefügt werden. Zwei

Oligonukleotide wurden synthetisiert, die mit Sequenzen in der 5'-untranslatierten Region (A: 5' GATCGAT-TAAGCTTCGGAACCCGCTCGATCTGCCGCC 3') bzw. kodierenden Region (B: 5' GCATATCTGGATCCC-CGTAGAATTTCTCTGAATCCCC 3') der Thromboplastin-cDNA hybridisieren können. Oligonukleotid A ist dabei teilweise homolog zur Sequenz des kodierenden Stranges, Oligonukleotid B ist teilweise homolog zum nicht-kodierenden Strang; vergl. Fig. 3.

Nach erfolgter Amplifizierung liegt also ein DNA-Fragment vor (827 bp), das (bezogen auf den kodierenden Strang) am 5'-Ende vor dem Beginn der kodierenden Sequenz eine HindIII-Stelle, am 3'-Ende nach den Kodons für die ersten drei Aminosäurereste der Transmembranregion eine BamHI-Stelle enthält. Der Leserahmen in der BamHI-Schnittstelle ist dergestalt, daß nach Ligierung mit der BamHI-Stelle in pCD4E gamma 1 eine Genfusion erreicht wird mit einem durchgehenden Leserahmen vom Initiationskodon der Thromboplastin-cDNA bis zum Stopkodon der schweren Kette des IgG1. Das erwünschte Fragment wurde erhalten und nach Behandlung mit HindIII und BamHI in den oben beschriebenen mit HindIII (partiell)/BamHI geschnittenen Vektor pCD4E gamma 1 ligiert. Das resultierende Plasmid erhielt den Namen pTF1Fc (Fig. 4).

Transfektion von pTF1Fc in Säugerzellen

Das durch das Plasmid pTF1Fc kodierte Fusionsprotein wird im folgenden als pTF1Fc bezeichnet. pTF1Fc wurde transient in COS-Zellen exprimiert. Hierzu wurden COS-Zellen mit Hilfe von DEAE-Dextran mit pTF1Fc transfiziert (EP A 0325 262).

Indirekte Immunfluoreszenzuntersuchungen ergaben ca. 25% als Anteil transzierter Zellen. 24 h nach Transfektion wurden die Zellen in serumfreies Medium überführt. Dieser Zellüberstand wurde nach weiteren drei Tagen geerntet.

Reinigung von pTF1Fc-Fusionsprotein aus Zellkulaturüberständen

170 ml Überstand von transient transfizierten COS-Zellen wurden über Nacht in einem Batchprozeß bei 4°C mit 0,8 ml Protein-A-Sepharose in einer Säule gesammelt, mit 10 Volumen Waschpuffer gewaschen (50mM Tris-Puffer pH 8,6, 150mM NaCl) und mit Elutionspuffer (100mM Citronensäure: 100mM NaCitrat 93:7) in 0,5 ml Fraktionen eluiert. Die ersten 9 Fraktionen wurden nach sofortiger Neutralisierung mit jeweils 0,1 ml 2M Tris-Puffer pH 8,6 vereinigt und das enthaltene Protein durch drei Zyklen Konzentration/Verdünnung im Amicon-Mikrokontrator (Centricon 30) in TNE-Puffer (50mM Tris-Puffer pH 7,4, 50mM NaCl, 1mM EDTA) überführt. Das so erhaltene pTF1Fc ist in der SDS-PAGE elektrophoretisch rein (U.K. Lämmli, Nature 227 (1970) 680-685). In Abwesenheit von Reduktionsmitteln verhält es sich in der SDS-PAGE wie ein Dimer (ca. 165

KDa).

Biologische Aktivität von gereinigtem TF1Fc in der Prothrombin-Gerinnungszeitbestimmung

TF1Fc-Fusionsprotein ist in niedrigen Konzentrationen (> 50 ng/ml) in der einstufigen Prothrombin-Gerinnungszeitbestimmung (Vinazzer, H. Gerinnungsphysiologie und Methoden im Blutgerinnungslabor (1979), 10 Fisher Verlag, Stuttgart) aktiv. Die erzielten Gerinnungszeiten sind vergleichbar mit den Gerinnungszeiten, die mit Thromboplastin, das aus humaner Plazenta isoliert wurde, erhalten werden.

Beispiel 2: Interleukin-4-Rezeptor-Fusionsproteine

Interleukin-4 (IL-4) wird von T-Zellen synthetisiert und wurde ursprünglich als B-Zell-Wachstumsfaktor bezeichnet, da es B-Zell-Proliferation stimulieren kann. Es 20 übt eine Vielzahl von Effekten auf diese Zellen aus. Insbesondere ist dies das Anregen der Synthese von Molekülen der Immunglobulinsubklassen IgG1 und IgE in aktivierten B-Zellen (Coffmann et al., Immunol. Rev., Bd. 102 (1988) 5). Darüber hinaus reguliert IL-4 auch 25 die Proliferation und Differenzierung von T-Zellen und anderen haematopoetischen Zellen. Es trägt somit zur Regulierung von allergischen und anderen immunologischen Reaktionen bei. IL-4 bindet mit hoher Affinität an einen spezifischen Rezeptor. Die cDNA, die für den humanen IL-4-Rezeptor kodiert, wurde isoliert (Idzerda et al., J.Exp.Med. Bd. 171 (1990) 861-873). Aus der Analyse der von der cDNA Sequenz abgeleiteten Aminosäuresequenz geht hervor, daß der IL-4 Rezeptor aus insgesamt 825 Aminosäuren besteht, wobei die N-terminalen 25 Aminosäuren als Signalpeptid fungieren. Reifer humaner IL-4-Rezeptor besteht aus 800 Aminosäuren und besitzt wie Thromboplastin eine Dreidomänenstruktur: i) aminotermrale extrazelluläre Domäne (207 Aminosäuren); ii) Transmembranregion (24 Aminosäuren) und iii) cytoplasmatische Domäne (569 Aminosäuren). In der extrazellulären Domäne existieren sechs potentielle Stellen für N-Glykosylierung (Asn-X-Thr/Ser). IL-4-Rezeptor besitzt Homologien zum humanen IL-6-Rezeptor, zur β-Untereinheit des humanen IL-45 2-Rezeptors, zum Maus-Erythropoietin-Rezeptor und zum Ratten-Prolaktinrezeptor (Idzerda et al., a.a.o.). Es ist somit wie Thromboplastin kein Mitglied der Immunglobulinfamilie, sondern wird zusammen mit den aufgeführten homologen Proteinen zur neuen Familie der 50 Haematopoetinrezeptoren gerechnet. Mitgliedern dieser Familie sind 4 Cysteinreste und eine sich in der Nähe der Transmembranregion befindliche konservierte Sequenz (Trp-Ser-X-Trp-Ser) in der extrazellulären Domäne gemeinsam. Aufgrund der beschriebenen Funktion des IL-4/IL-4-Rezeptorsystems ist ein therapeutischer Einsatz einer rekombinanten Form des IL-4-Rezeptors zur Unterdrückung IL-4-vermittelter Immunreaktionen (z.B.

Transplantationsabstoßungsreaktion, Autoimmunkrankheiten, allergische Reaktionen) möglich.

Die für eine Therapie erforderliche Substanzmenge machen eine gentechnische Herstellung solcher Moleküle notwendig. Erfindungsgemäß ist wegen der problemlosen Reinigung durch Affinitätschromatographie und der verbesserten pharmakokinetischen Eigenschaften die Synthese von löslichen Formen des IL-4-Rezeptors als Immunglobulinfusionsprotein besonders vorteilhaft.

Die IL-4-Rezeptor-Fusionsproteine werden von Säugerzellen (z.B. CHO-, BHK-, COS-Zellen) in das Kulturmedium ausgeschleust, über Affinitätschromatographie an Protein-A-Sepharose gereinigt und besitzen überraschenderweise identische funktionelle Eigenschaften wie die extrazelluläre Domäne des intakten membrangebundenen IL-4-Rezeptormoleküls.

Konstruktion eines für IL-4-Rezeptor-Fusionsprotein kodierenden Hybridplasmids pIL4RFc.

Wird das Plasmid pCD4EGamma1 mit Xhol und BamHI geschnitten, liegt ein geöffneter Vektor vor, bei dem die offene Xhol-Stelle "downstream" von der Promotersequenz liegt. Die offene BamHI-Stelle liegt am Beginn der kodierenden Regionen für einen Pentapeptidlinker, gefolgt von den Hinge- und den CH2- und CH3-Domänen vom menschlichen IgG1. Der Leserahmen in der BamHI-Erkennungssequenz GGATCC ist dergestalt, daß GAT als Asparaginsäure translatiert wird. DNA-Amplifizierung mit thermostabiler DNA-Polymerase ermöglicht eine gegebene Sequenz so zu verändern, daß an eines oder beide Enden beliebige Sequenzen angefügt werden. Zwei Oligonukleotide wurden synthetisiert, die mit Sequenzen in der 5'-untranslatierten Region (A: 5' GATCCAGTACTCGAGAGA-GAAGCCGGCGTGGCTCATGC 3') bzw. kodierenden Region (B: 5' CTATGACATGGATCCTGCTC-GAAGGGCTCCCTGTAGGAGTTGTG 3') der IL-4-Rezeptor-cDNA, die kloniert im Vektor pDC302/T22-8 vorliegt (Idzerda et al., a.a.O.), hybridisieren können. Oligonukleotid A ist dabei teilweise homolog zur Sequenz des kodierenden Stranges, Oligonukleotid B ist teilweise homolog zum nicht-kodierenden Strang; vergl. Fig. 5. Nach erfolgter Amplifizierung mittels thermostabiler DNA-Polymerase liegt ein DNA-Fragment vor (836 bp), das bezogen auf den kodierenden Strang am 5'-Ende vor dem Beginn der kodierenden Sequenz eine Xhol-Stelle, am 3'-Ende vor dem letzten Kodon der extrazellulären Domäne eine BamHI-Stelle enthält. Der Leserahmen in der BamHI-Schnittstelle ist dergestalt, daß nach Ligierung mit der BamHI-Stelle in pCD4E gamma 1 eine Genfusion erreicht wird mit einem durchgehenden Leserahmen vom Initiationskodon der IL-4-Rezeptor-cDNA bis zum Stopkodon der schweren Kette des IgG1. Das erwünschte Fragment wurde erhalten und nach Behandlung mit Xhol und BamHI in den oben beschriebenen mit Xhol/BamHI geschnittenen

Vektor pCD4E gamma 1 ligiert. Das resultierende Plasmid erhielt den Namen pIL4RFc (Fig. 6).

Transfektion von pIL4RFc in Säugerzellen

Das durch das Plasmid pIL4RFc kodierte Fusionsprotein wird im folgenden als pIL4RFc bezeichnet. pIL4RFc wurde transient in COS-Zellen exprimiert. Hierzu wurden COS-Zellen mit Hilfe von DEAE-Dextran mit pIL4RFc transfiziert (EP A 0325 262). Indirekte Immunfluoreszenzuntersuchungen ergaben ca. 25% als Anteil transfizierter Zellen. 24 h nach Transfektion wurden die Zellen in serumfreies Medium überführt. Dieser Zellüberstand wurde nach weiteren drei Tagen geerntet.

Reinigung von IL4RFc-Fusionsprotein aus Zellkulturnüberständen

500 ml Überstand von transient transfizierten COS-Zellen wurden über Nacht in einem Batchprozeß bei 4°C mit 1,6 ml Protein-A-Sepharose in einer Säule gesammelt, mit 10 Volumen Waschpuffer gewaschen (50mM Tris-Puffer pH 8,6, 150mM NaCl) und mit Elutionspuffer (100mM Citronensäure: 100mM NaCitrat 93: 7) in 0,5 ml Fraktionen eluiert. Die ersten 9 Fraktionen wurden nach sofortiger Neutralisierung mit jeweils 0,1 ml 2M Tris-Puffer pH 8,6 vereinigt und das enthaltene Protein durch drei Zyklen Konzentration/Verdünnung im Amicon-Mikrokonzentratoren (Centricon 30) in TNE-Puffer (50mM Tris-Puffer pH 7,4, 50mM NaCl, 1mM EDTA) überführt. Das so erhaltene IL4RFc ist in der SDS-PAGE elektrophoretisch rein (U.K. Lämmli, Nature 227 (1970) 680-685). In Abwesenheit von Reduktionsmitteln verhält es sich in der SDS-PAGE wie ein Dimer (ca. 150 KDa).

Biologische Aktivität von gereinigtem IL4RFc

IL4RFc-Protein bindet ¹²⁵I-radiomarkiertes IL-4 mit gleicher Affinität (KD=0,5nM) wie membrangebundener, intakter IL-4-Rezeptor. Es hemmt die Proliferation der IL-4-abhängigen Zelllinie CTLLHuIL-4RI Klon D (Idzerda et al., a.a.O.) in Konzentrationen von 10-1000 ng/ml. Darüber hinaus eignet es sich hervorragend für die Entwicklung von IL-4-Bindungstests, da es über seinen Fc-Teil an mit z.B. Kaninchen-antihuman-IgG vorbeschichtete Mikrotiterplatten gebunden werden kann und in dieser Form ebenfalls mit hoher Affinität seinen Liganden bindet.

Beispiel 3: Erythropoietin-Fusionsproteine

Reifes Erythropoietin (EPO) ist ein aus 166 Aminosäuren bestehendes Glykoprotein, das essentiell für die Entwicklung von Erythrozyten ist. Es stimuliert die Reifung und die terminale Differenzierung erythroider Vorläuferzellen. Die cDNA für humanes EPO wurde kloniert (EPA-0267 678) und kodiert für die 166 Aminosäuren

des reifen EPO und ein für die Sezernierung essentielles Signalpeptid von 22 Aminosäuren. Mit Hilfe der cDNA kann rekombinantes funktionelles EPO in gentechnisch veränderten Sägerzellen hergestellt werden und zur Therapie von anämischen Erscheinungen verschiedenen Ursprungs (z.B. bei akuten Nierenversagen) klinisch eingesetzt werden.

Erfindungsgemäß ist wegen der problemlosen Reinigung und der verbesserten pharmakokinetischen Eigenschaften die Synthese von EPO als Immunglobulin-fusionsprotein besonders vorteilhaft.

Konstruktion eines für Erythropoietin-Fusionsprotein kodierenden Hybridplasmids pEPOFc.

Diese Konstruktion erfolgte analog zu der im Beispiel 2 beschriebenen (Abschnitt: "Konstruktion eines für IL-4-Rezeptor-Fusionsprotein kodierenden Hybridplasmids pIL-4RFc"). Zwei Oligonukleotide wurden synthetisiert, die mit Sequenzen in der Nähe des Initiationskodons (A: 5'GATCGATCTCGAGATGGGGTGCAC-GAATGTCCTGCCTGGCTGTGG 3') bzw. des Stopkodons (B: 5' CTGGAATCGGATCCCCTGTCCTGCAGGCCTCCCCTGTGTACAGC 3') der im Vektor pCES klonierten EPO-cDNA (EP A 0267 678) hybridisieren können. Oligonukleotid A ist dabei teilweise homolog zur Sequenz des kodierenden Stranges, Oligonukleotid B ist teilweise homolog zum nicht-kodierenden Strang; vergl. Fig. 7. Nach erfolgter Amplifizierung liegt mittels thermostabiler DNA-Polymerase ein DNA-Fragment vor (598 bp), das bezogen auf den kodierenden Strang am 5'-Ende vor dem Initiationskodon eine Xhol-Stelle enthält und in dem am 3'-Ende das Kodon für den vorletzten C-terminalen Aminosäurerest von EPO (Asp) in einer BamHI-Erkennungssequenz vorliegt. Der Leserahmen in der BamHI-Schnittstelle ist dergestalt, daß nach Ligierung mit der BamHI-Stelle in pCD4E gamma 1 eine Genfusion erreicht wird mit einem durchgehenden Leserahmen vom Initiationskodon der EPO-cDNA bis zum Stopkodon der schweren Kette des IgG1. Das erwünschte Fragment wurde erhalten und nach Behandlung mit Xhol und BamHI in den oben beschriebenen mit Xhol/BamHI geschnittenen Vektor pCD4E gamma 1 ligiert. Das resultierende Plasmid erhielt den Namen pEPOFc (Fig. 8).

Patentansprüche

Patentansprüche für folgende Vertragsstaaten : AT, BE, CH, DE, DK, FR, GB, IT, LI, LU, NL, SE

1. Lösliches Fusionsprotein, bestehend aus dem extrazellulären Anteil von humanem Tumor-Nekrose-Faktor-Rezeptor oder einem funktionellen Teil davon und einem Fc-Teil eines Immunglobulinmoleküls, ausgewählt aus einer der Immunglobulinklassen IgG, IgM, IgA und IgE, dadurch gekennzeichnet, daß die für diese Konstrukte kodierende DNA in ein Sägerzellexpressionssystem eingebracht und nach Expression das gebildete Fusionsprotein mittels Affinitätschromatographie über den Immunglobulinanteil gereinigt wird.

sen IgG, IgM, IgA und IgE.

2. Fusionsprotein nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß der Anteil des Immunglobulinmoleküls über seine Hinge-Region mit dem extrazellulären Teil vom Tumor-Nekrose-Faktor-Rezeptor verbunden ist.
3. Fusionsprotein nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß der Anteil des Immunglobulinmoleküls aus der konstanten Region der schweren Kette von humanem IgG besteht.
4. Fusionsprotein nach Anspruch 3, dadurch gekennzeichnet, daß der Anteil des Immunglobulinmoleküls aus der konstanten Region der schweren Kette von humanem IgG1 oder einem Protein A-bindenden Fragment davon besteht.
5. Verfahren zur Herstellung von Fusionsproteinen nach einem der Ansprüche 1-4, dadurch gekennzeichnet, daß die für diese Konstrukte kodierende DNA in ein Sägerzellexpressionssystem eingebracht und nach Expression das gebildete Fusionsprotein mittels Affinitätschromatographie über den Immunglobulinanteil gereinigt wird.
6. Verwendung der Fusionsproteine nach einem der Ansprüche 1-4 zur Diagnostik in vitro.
7. Fusionsprotein nach einem der Ansprüche 1-4 als Arzneimittel.

Patentansprüche für folgenden Vertragsstaat : ES

1. Verfahren zur Herstellung von löslichen Fusionsproteinen, bestehend aus dem extrazellulären Anteil von humanem Tumor-Nekrose-Faktor-Rezeptor oder einem funktionellen Teil davon und einem Fc-Teil eines Immunglobulinmoleküls, ausgewählt aus einer der Immunglobulinklassen IgG, IgM, IgA und IgE, dadurch gekennzeichnet, daß die für diese Konstrukte kodierende DNA in ein Sägerzellexpressionssystem eingebracht und nach Expression das gebildete Fusionsprotein mittels Affinitätschromatographie über den Immunglobulinanteil gereinigt wird.
2. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß der Anteil des Immunglobulinmoleküls über seine Hinge-Region mit dem extrazellulären Teil von Tumor-Nekrose-Faktor-Rezeptor verbunden ist.
3. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß der Anteil des Immunglobulinmoleküls aus der konstanten Region der schweren Kette von hu-

manem IgG besteht.

4. Verfahren nach Anspruch 3, dadurch gekennzeichnet, daß der Anteil des Immunglobulinmoleküls aus der konstanten Region der schweren Kette von humanem IgG1 oder einem Protein A-bindenden Fragment davon besteht.

Patentansprüche für folgenden Vertragsstaat : GR

1. Lösliches Fusionsprotein, bestehend aus dem extrazellulären Anteil von humanem Tumor-Nekrose-Faktor-Rezeptor oder einem funktionellen Teil davon und einem Fc-Teil eines Immunglobulinmoleküls, ausgewählt aus einer der Immunglobulinklassen IgG, IgM, IgA und IgE.
2. Fusionsprotein nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß der Anteil des Immunglobulinmoleküls über seine Hinge-Region mit dem extrazellulären Teil von Tumor-Nekrose-Faktor-Rezeptor verbunden ist.
3. Fusionsprotein nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß der Anteil des Immunglobulinmoleküls aus der konstanten Region der schweren Kette von humanem IgG besteht.
4. Fusionsprotein nach Anspruch 3, dadurch gekennzeichnet, daß der Anteil des Immunglobulinmoleküls aus der konstanten Region der schweren Kette von humanem IgG1 oder einem Protein A-bindenden Fragment davon besteht.
5. Verfahren zur Herstellung von Fusionsproteinen nach einem der Ansprüche 1-4, dadurch gekennzeichnet, daß die für diese konstruktive kodierende DNA in ein Säugerzellexpressionssystem eingebracht und nach Expression das gebildete Fusionsprotein mittels Affinitätschromatographie über den Immunglobulinanteil gereinigt wird.
6. Verwendung der Fusionsproteine nach einem der Ansprüche 1-4 zur Diagnostik in vitro.

Claims

Claims for the following Contracting States : AT, BE, CH, DE, DK, FR, GB, IT, LI, LU, NL, SE

1. A soluble fusion protein consisting of the extracellular portion of human tumour necrosis factor receptor or a functional part thereof and of a necessary part of an immunoglobulin molecule selected from one of the immunoglobulin classes IgG, IgM, IgA

and IgE.

2. A fusion protein as claimed in claim 1, wherein the portion of the immunoglobulin molecule is connected via its hinge region to the extracellular part of the tumour necrosis factor receptor.
3. A fusion protein as claimed in claim 1, wherein the portion of the immunoglobulin molecule consists of the constant region of the heavy chain of human IgG.
4. A fusion protein as claimed in claim 3, wherein the portion of the immunoglobulin molecule consists of the constant region of the heavy chain of human IgG1 or a protein A-binding fragment thereof.
5. A process for preparing fusion proteins as claimed in any of claims 1 - 4, which comprises introducing the DNA coding for these constructs into a mammalian cell expression system and, after expression, purifying the fusion protein which has been formed by affinity chromatography via the immunoglobulin portion.
6. The use of the fusion proteins as claimed in any of claims 1 - 4 for in vitro diagnosis.
7. A fusion protein as claimed in any of claims 1 - 4 as pharmaceutical.

Claims for the following Contracting State : ES

35. 1. A process for preparing soluble fusion proteins consisting of the extracellular portion of human tumour necrosis factor receptor or a functional part thereof and of a necessary part of an immunoglobulin molecule selected from one of the immunoglobulin classes IgG, IgM, IgA and IgE, which comprises introducing the DNA coding for these constructs into a mammalian cell expression system and, after expression, purifying the fusion protein which has been formed by affinity chromatography via the immunoglobulin portion.
2. A process as claimed in claim 1, wherein the portion of the immunoglobulin molecule is connected via its hinge region to the extracellular part of the tumour necrosis factor receptor.
3. A process as claimed in claim 1, wherein the portion of the immunoglobulin molecule consists of the constant region of the heavy chain of human IgG.
4. A process as claimed in claim 3, wherein the portion of the immunoglobulin molecule consists of the constant region of the heavy chain of human IgG1 or

protein A-binding fragment thereof.

Claims for the following Contracting State : GR

1. A soluble fusion protein consisting of the extracellular portion of human tumour necrosis factor receptor or a functional part thereof and of a necessary part of an immunoglobulin molecule selected from one of the immunoglobulin classes IgG, IgM, IgA and IgE.
2. A fusion protein as claimed in claim 1, wherein the portion of the immunoglobulin molecule is connected via its hinge region to the extracellular part of the tumour necrosis factor receptor.
3. A fusion protein as claimed in claim 1, wherein the portion of the immunoglobulin molecule consists of the constant region of the heavy chain of human IgG.
4. A fusion protein as claimed in claim 3, wherein the portion of the immunoglobulin molecule consists of the constant region of the heavy chain of human IgG1 or a protein A-binding fragment thereof.
5. A process for preparing fusion proteins as claimed in any of claims 1 - 4, which comprises introducing the DNA coding for these constructs into a mammalian cell expression system and, after expression, purifying the fusion protein which has been formed by affinity chromatography via the immunoglobulin portion.
6. The use of the fusion proteins as claimed in any of claims 1 - 4 for in vitro diagnosis.

Revendications

Revendications pour les Etats contractants suivants : AT, BE, CH, DE, DK, FR, GB, IT, LI, LU, NL, SE

1. Protéine de fusion soluble, constituée du segment extracellulaire du récepteur de facteur de nécrose tumorale humain, ou d'un fragment fonctionnel de celui-ci, et d'un segment Fc d'une molécule d'immunoglobuline, choisie dans l'une des classes d'immunoglobulines IgG, IgM, IgA et IgE.
2. Protéine de fusion selon la revendication 1, caractérisée en ce que le segment de la molécule d'immunoglobuline est relié par sa région charnière au segment extracellulaire du récepteur de facteur de nécrose tumorale.

3. Protéine de fusion selon la revendication 1, caractérisée en ce que le segment de la molécule d'immunoglobuline consiste en la région constante de la chaîne lourde d'IgG humaine.

4. Protéine de fusion selon la revendication 3, caractérisée en ce que le segment de la molécule d'immunoglobuline consiste en la région constante de la chaîne lourde d'IgG1 humaine ou d'un fragment de celle-ci se liant à la protéine A.

5. Procédé pour la production de protéines de fusion selon l'une des revendications 1 à 4, caractérisé en ce que l'ADN codant pour ces produits de construction est introduit dans un système d'expression de type cellule de mammifère, et, après expression de la protéine de fusion formée, est purifié par chromatographie d'affinité sur le segment d'immunoglobuline.

6. Utilisation des protéines de fusion selon l'une des revendications 1 à 4, pour le diagnostic in vitro.

7. Protéine de fusion selon l'une des revendications 1 à 4, en tant que médicament.

Revendications pour l'Etat contractant suivant : ES

30. 1. Procédé pour la production de protéines de fusion solubles, constituées du segment extracellulaire du récepteur de facteur de nécrose tumorale humain, ou d'un fragment fonctionnel de celui-ci, et d'un segment Fc d'une molécule d'immunoglobuline, choisie dans l'une des classes d'immunoglobulines IgG, IgM, IgA et IgE, caractérisé en ce que l'ADN codant pour ces produits de construction est introduit dans un système d'expression de type cellule de mammifère, et, après expression de la protéine de fusion formée, est purifié par chromatographie d'affinité sur le segment d'immunoglobuline.
35. 2. Procédé selon la revendication 1, caractérisé en ce que le segment de la molécule d'immunoglobuline est relié par sa région charnière au segment extracellulaire du récepteur de facteur de nécrose tumorale.
40. 3. Procédé selon la revendication 1, caractérisé en ce que le segment de la molécule d'immunoglobuline consiste en la région constante de la chaîne lourde d'IgG humaine.
45. 4. Procédé selon la revendication 3, caractérisé en ce que le segment de la molécule d'immunoglobuline consiste en la région constante de la chaîne lourde d'IgG1 humaine ou un fragment de celle-ci se liant à la protéine A.

Revendications pour l'Etat contractant suivant : GR

1. Protéine de fusion soluble, constituée du segment extracellulaire du récepteur de facteur de nécrose tumorale humain, ou d'un fragment fonctionnel de celui-ci, et d'un segment Fc d'une molécule d'immunoglobuline choisie dans l'une des classes d'immunoglobulines IgG, IgM, IgA et IgE. 5
2. Protéine de fusion selon la revendication 1, caractérisée en ce que le segment de la molécule d'immunoglobuline est relié par sa région charnière au segment extracellulaire du récepteur de facteur de nécrose tumorale. 10
3. Protéine de fusion selon la revendication 1, caractérisée en ce que le segment de la molécule d'immunoglobuline consiste en la région constante de la chaîne lourde d'IgG humaine. 15
4. Protéine de fusion selon la revendication 3, caractérisée en ce que le segment de la molécule d'immunoglobuline consiste en la région constante de la chaîne lourde d'IgG1 humaine ou un fragment de celle-ci se liant à la protéine A. 20
5. Procédé pour la production de protéines de fusion selon l'une des revendications 1 à 4, caractérisé en ce que l'ADN codant pour ces produits de construction est introduit dans un système d'expression de type cellules mammaliennes, et, après expression de la protéine de fusion formée, est purifié par chromatographie d'affinité sur le segment d'immunoglobuline. 25
6. Utilisation des protéines de fusion selon l'une des revendications 1 à 4, pour le diagnostic in vitro. 30

35

40

45

50

55

Fig. 1

121 GTCGCTCGGACGCTCCTGCTCGGCTGGTCTTCGCCAGGTGGCCGGCGCTTCAGGCACT
 CAGCGAGCCTGCGAGGACGAGCCGACCCAGAAGCGGGTCCACCGGCCGCGAAGTCCGTGA
 <*****
 Oligonukleotid 1

181 ACAAAACTGTGGCAGCATATAATTAACTTGAAATCAACTAATTCAAGACAATTTG
-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 240
TGTATGACACCGTCGTATATTAAATTGAAACCTTGTGATTAAAGTTCTGTTAAAC
*****|*****

Oligonukleotid 2

```

|*****>
AACTACTGTTCAAGCAGTGATTCCCTCCGAACAGTTAACCGGAAGAGTACA
721-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 780
TTGATGACAAAGTCACAAGTTCGTCACTAAGGGAGGGCTTGTCAATTGGCCTCTCATGT

```

Fig. 2

10 30 50
 GCCCCCCCTCGAGGTCACGGTATCGATAAGCTTGTATCGAATTCTCTCGCGAACCCC
 70 90 110
 CTCGCACTCCCTCTGGCCGGCCCAGGGCGCCCTCAGCCCAACCTCCCCAGCCCCACGGGC
 130 150 170
 GCCACGGAACCCGCTCGATCTGCCGCCAACTGGTAGACATGGAGACCCCTGCCTGGCCC
 MetGluThrProAlaTrpPro
 190 210 230
 CGGGTCCCAGCCCCGAGACCGCCGTCGCTCGGACGCTCTGCTCGGCTGGTCTTCGCC
 ArgValProArgProGluThrAlaValAlaArgThrLeuLeuLeuGlyTrpValPheAla
 250 270 290
 CAGGTGGCGCGCTTCAGGCACTACAAATACTGTGGCAGCATATAATTAACTTGGAAA
 GlnValAlaGlyAlaSerGlyThrThrAsnThrValAlaAlaTyrAsnLeuThrTrpLys
 310 330 350
 TCAACTAATTCAAGACAATTGGAGTGGGAACCCAAACCGTCAATCAAGTCTACACT
 SerThrAsnPheLysThrIleLeuGluTrpGluProLysProValAsnGlnValTyrThr
 370 390 410
 GTTCAAATAAGCACTAAGTCAGGAGATTGGAAAAGCAAATGCTTTACACAACAGACACA
 ValGlnIleSerThrLysSerGlyAspTrpLysSerLysCysPheTyrThrThrAspThr
 430 450 470
 GAGTGTGACCTCACCGACGAGATTGTGAAGGATGTGAAGCAGACGTACTTGGCACGGTC
 GluCysAspLeuThrAspGluIleValLysAspValLysGlnThrTyrLeuAlaArgVal
 490 510 530
 TTCTCCTACCCGGCAGGGATGTGGAGAGCACCCTGCTGGGGAGCCTGTATGAG
 PheSerTyrProAlaGlyAsnValGluSerThrGlySerAlaGlyGluProLeuTyrGlu
 550 570 590
 AACTCCCCAGAGTTCACACCTACCTGGAGACAAACCTCGGACAGCCAAACAATTAGAGT
 AsnSerProGluPheThrProTyrLeuGluThrAsnLeuGlyGlnProThrIleGlnSer

Fig. 2 (Fortsetzung)

610 630 650
 TTTGAAACAGGTGGGAACAAAAGTGAATGTGACCGTAGAAGATGAACGGACTTAGTCAGA
 PheGluGlnValGlyThrLysValAsnValThrValGluAspGluArgThrLeuValArg

 670 690 710
 AGGAACAAACACTTCTCTAACGCTCCGGGATGTTGGCAAGGACTTAATTATACACTT
 ArgAsnAsnThrPheLeuSerLeuArgAspValPheGlyLysAspLeuIleTyrThrLeu

 730 750 770
 TATTATTGGAAATCTTCAAGTTCAAGTCAGGAAAGAAAACAGCCAAACAAACACTAATGAGTTT
 TyrTyrTrpLysSerSerSerGlyLysLysThrAlaLysThrAsnThrAsnGluPhe

 790 810 830
 TTGATTGATGTGGATAAAGGAGAAAACTACTGTTCAAGCAGTGTGATTCCCTCC
 LeuIleAspValAspLysGlyGluAsnTyrCysPheSerValGlnAlaValIleProSer

 850 870 890
 CGAACAGTTAACCGGAAGAGTACAGACAGCCCGGTAGAGTGTATGGGCCAGGAGAAAGGG
 ArgThrValAsnArgLysSerThrAspSerProValGluCysMetGlyGlnGluLysGly

 910 930 950
 GAATTCAAGAGAAATATTCTACATCATTGGAGCTGTGGTATTTGTGGTCATCATCCTTGTGTC
 GluPheArgGluIlePheTyrIleIleGlyAlaValValPheValValIleIleLeuVal

 970 990 1010
 ATCATCCTGGCTATATCTACACAAGTGTAGAAAGGCAGGAGTGGGGCAGAGCTGGAAAG
 IleIleLeuAlaIleSerLeuHisLysCysArgLysAlaGlyValGlyGlnSerTrpLys

 1030 1050 1070
 GAGAACTCCCCACTGAATGTTCATAAAGGAAGCAGTGTGGAGCTACTGCAAATGCTAT
 GluAsnSerProLeuAsnValSer

 1090 1110 1130
 ATTGCACTGTGACCGAGAACTTTAAGAGGGATAGAATACATGGAAACGCAAATGAGTATT

 1150 1170 1190
 TCGGAGCATGAAGACCCCTGGAGTTCAAAAAACTCTTGATATGACCTGTTATTACCAATTAG

Fig. 2 (Fortsetzung)

1210	1230	1250
CATTCTGGTTTGACATCAGCATTAGTCACTTGAAATGTAACGAATGGTACTACAACCA		
1270	1290	1310
ATTCCAAGTTTAATTTAACACCATGGCACCTTGCACATAACATGCTTAGATTAT		
1330	1350	1370
ATATTCCGCACTTAAGGATTAACCAGGTGTCAGCAAGCAAAACAAATGGGAAATGTCTT		
1390	1410	1430
AAAAAAATCCTGGGTGGACTTTGAAAAGCTTTTTTTTTTTTTGAGACGGAGTC		
1450	1470	1490
TTGCTCTGTTGCCAGGCTGGAGTGCAGTAGCACGATCTGGCTCACTTGCACCCCTCCGT		
1510	1530	1550
CTCTCGGGTTCAAGCAATTGTCAGCCTCCCGAGTAGCTGGGATTACAGGTGGC		
1570	1590	1610
ACTACCACGCCAAGCTAATTTGTATTTTAGTAGAGATGGGTTTACCATCTTGGC		
1630	1650	1670
CAGGCTGGTCTTGAATTCTGACCTCAGTGATCCACCCACCTGGCTCCAAAGATGCT		
1690	1710	1730
AGTATTATGGCGTGAACCACCATGCCAGCCGAAAGCTTTGAGGGCTGACTCAAT		
1750	1770	1790
CCATGTAGGAAAGTAAATGGAAGGAAATTGGGTGCATTCTAGGACTTTCTAACATAT		
1810	1830	1850
GTCTATAATATAGTGTAGGTTCTTTTTTCAAGGAATACATTTGGAAATTCAAAAC		
1870	1890	1910
AATTGGGCAAACTTGTATTAATGTGTTAAGTGCAGGAGACATTGGTATTCTGGCAGCT		

Fig. 2 (Fortsetzung)

1930

1950

1970

TCCTAATATGCTTACAATCTGCACTTAACTGACTTAAGTGGCATTAAACATTTGAGAG

1990

2010

2030

CTAACTATATTTTATAAGACTACTATACAAACTACAGAGTTATGATTAAAGGTACTTA

2050

2070

2090

AAGCTTCTATGGTTGACATTGTATATATAATTTTTAAAAAGGTTTCTATATGGGGAT

2110

2130

2150

TTTCTATTATGTAGGTAATATTGTTCTATTGTATATATTGAGATAATTATTTAATAT

2170

ACTTTAAATAAGGTGACTGGGAATTGTT

Fig. 3

HindIII

5' GATCGATTAAGCTTCGGAACCCGCTCGATCTGCCGCC 3' Oligonukleotid A

-----||||||||||||||||||||||

AGCCCCACGGGCGCCACGGAACCCGCTCGATCTGCCGCCAACTGGTAGACATGGAG

110 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+----- 167

TCGGGGTCCCCGGTGCCTGGCGAGCTAGAGCGGGGTTGACCATCTGTACCTC

MetGlu

-----|-----

5'-untranslatiert

Beginn

Leserahmen

(Signalpeptid)

-----|-----
Ende extrazelluläre Domäne | Beginn Transmembranregion

GlnGluLysGlyGluPheArgGluIlePheTyrIleIleGlyAlaVal

CAGGAGAAAGGGATTCAAGAGAAATTCTACATCATTGGAGCTGTGGT

890 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 940

GTCCTCTTCCCCCTTAAGTCTCTTATAAGATGTAGTAACCTCGACACCA

||||||||||||||||||

3' CCCCTTAAGTCTCTTATAAGATGCCCTAGGTCTATACG 5' Oligonukleotid B

BamHI

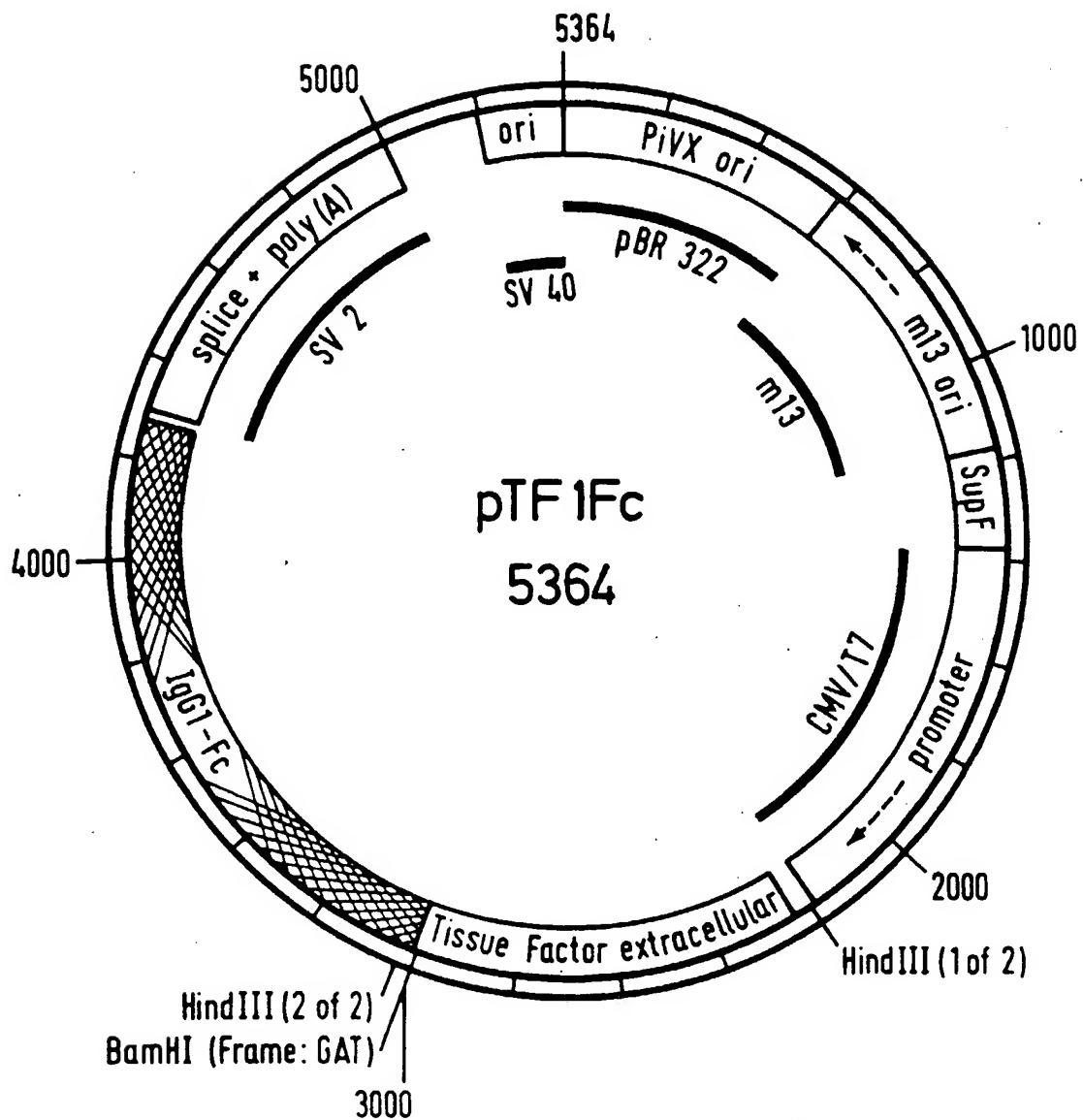


Fig. 4

Fig. 5

Xhol

5' GATCCAGTACTCGAGAGAGAACCGGGCGTGGTGGCTCATGC 3' Oligonukleotid A

-----|:|||||:|||||:|||||:|||||:|||||:|

AGAGAACCGGGCGTGGTGGCTCATGCCTATAATCCCAGCACTTTGGAGGCTGAGGCCG

61 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 120

TCTCTCGGCCCCGCACCCACCGAGTACGGATATTAGGGTCGTGAAAACCTCCGACTCCGCC

-----5'-untranslatiert-----

GCAGATCACTTGAGATCAGGAGTTCGAGACCAAGCCTGGTGCCTGGCATCTCCAAATGGG

121 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 180

CGTCTAGTGAACTCTAGTCTCAAGCTCTGGTCGGACCACGGAACCGTAGAGGGTTACCC

-----5'-untranslatiert-----|MetGly

Beginn
Leserahmen (Signalpeptid)

Ende extrazelluläre Domäne | Beginn Transmembranregion

-----|-----

HisAsnSerTyrArgGluProPheGluGlnHisLeuLeuLeuGlyValSerValSerCys

CACAACCTCCTACAGGGAGCCCTCGAGCAGCACCTCTGCTGGCGTCAGCGTTCTGC

839 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 898

GTGTTGAGGATGTCCCTCGGGAAAGCTCGTCGTGGAGGACGACCCGCAGTCGCAAAGGACG

|||||:|||||:|||||:|||||:|||||:|

3' GTGTTGAGGATGTCCCTCGGGAAAGCTCGTCCTAGGTACAGTATC 5' Oligonukleotid B

BamHI

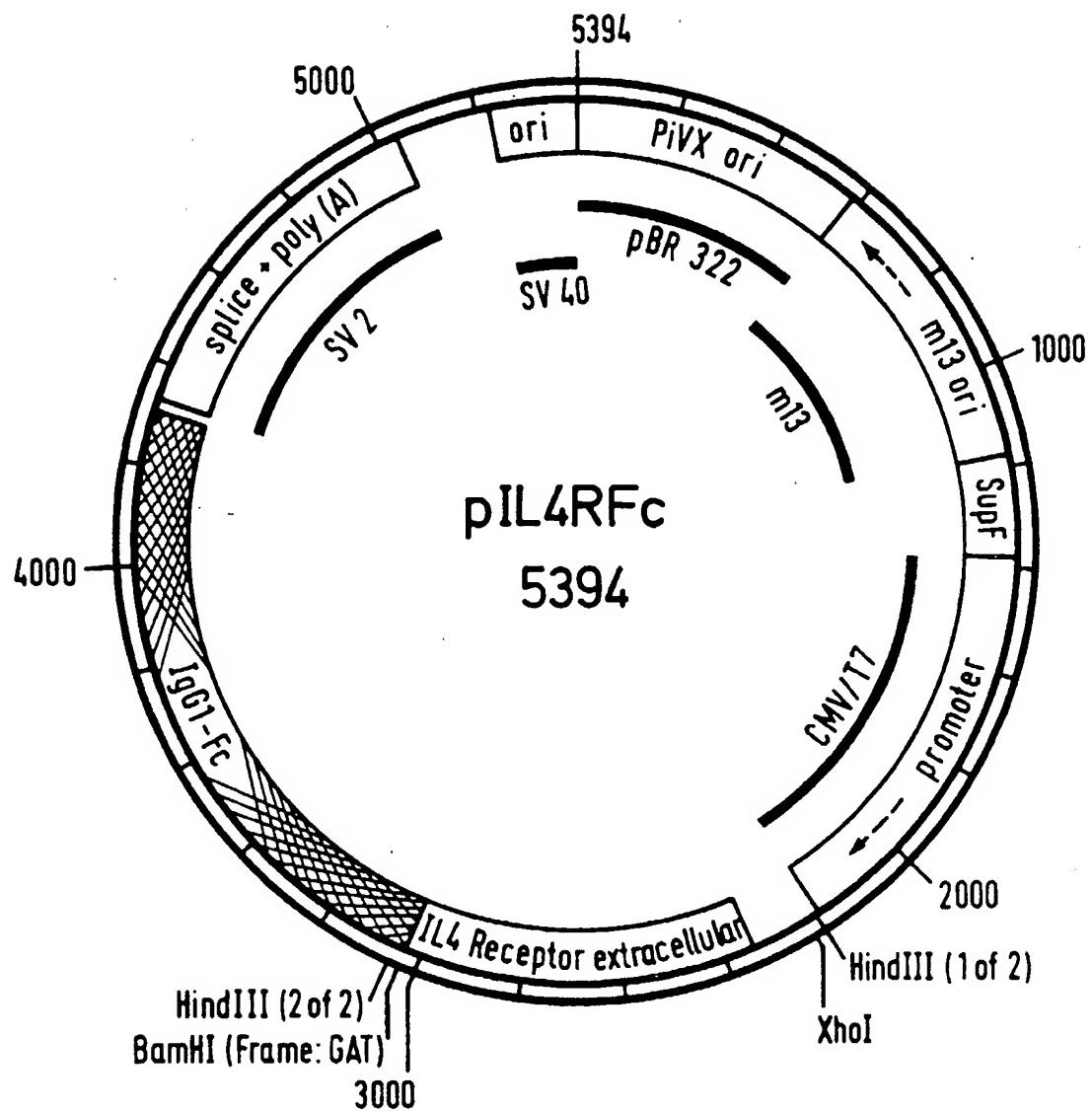


Fig. 6

Fig. 7

Xhol

5' GATCGATCTGAGATGGGGTGCACGAATGTCTGCCTGGCTGTGG 3' Oligonukleotid A

A decorative horizontal line. It begins with a dashed line segment on the left, followed by a series of vertical tick marks of varying lengths extending to the right.

ATGGGGGTGCACGAATGTCTGCCTGGCTGTGGCTTCCTGTCCTGCTGTCG

182 -----+-----+-----+-----+-----+-----+----- 235

TACCCCCACGTGTTACAGGACGGACCGACACCGAAGAGGGACAGGGACGACAGC

MetGlyValHisGluCysProAlaTrpLeuTrpLeuleuLeuSerLeuLeuSer -

Beginn Leserahmen (Signalpeptid)

Ende Leserahmen-----|

LeuTyrThrGlyGluAlaCysArgThrGlyAspArgEnd

-----|

GCTGTACACAGGGGAGGCCTGCAGGACAGGGGACAGATGACCAGGTGTCCACCTGGGC

CGACATGTGTCCCCCTCCGGACGTCCGTCCCCGTCTACTGGTCCACACAGGTGGACCCG

3' CGACATGTGTCCCCCTCCGGACGTCTGTCCCCCTAGGCTAAGGTC 5' Oligonukleotid B

BamHI

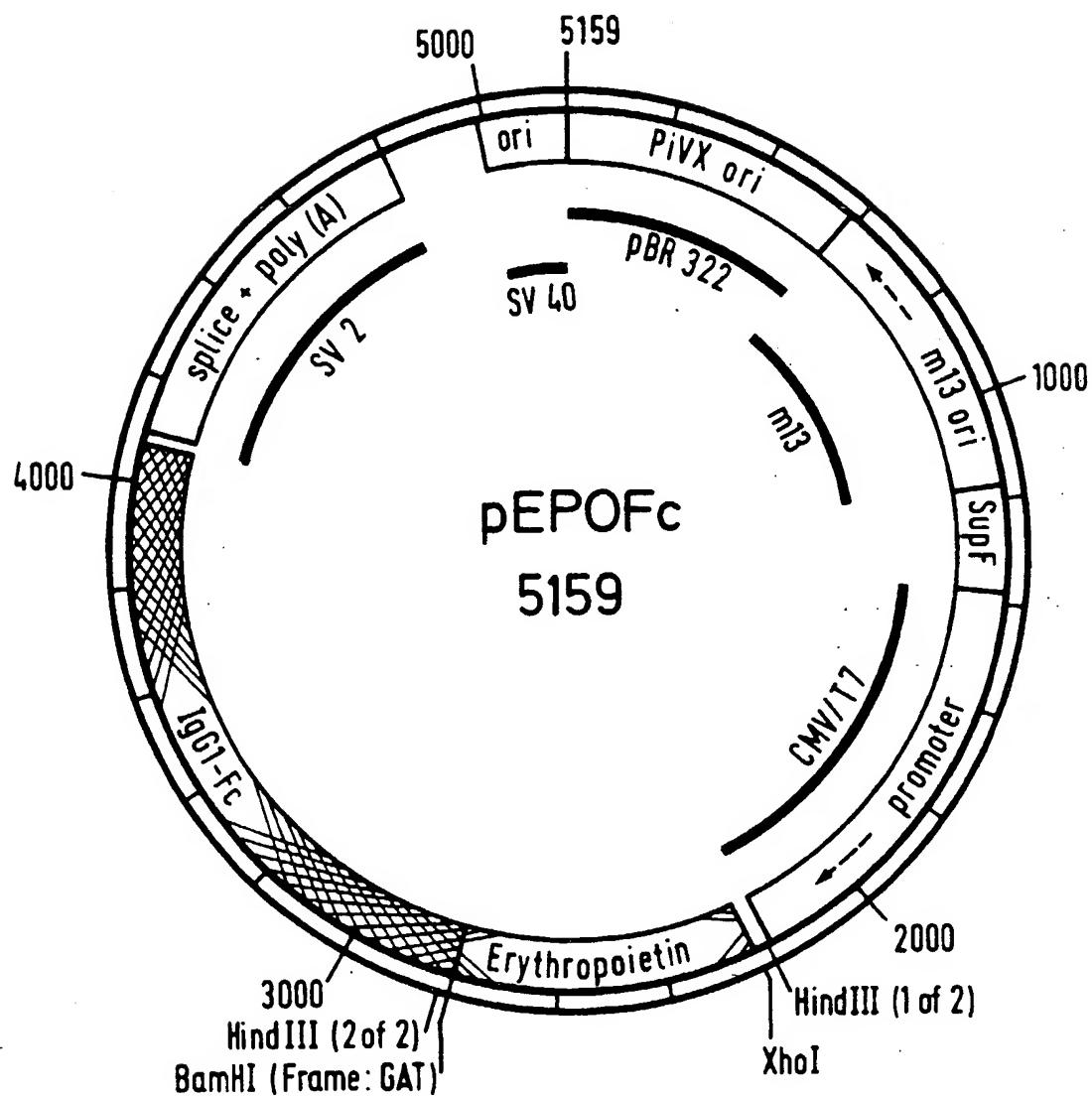


Fig. 8